

PCT

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 48/00, 9/14, 31/70, 35/76, 47/10, 47/18, 47/26 // C12N 7/01, 15/68, 15/86		A1	(11) 国際公開番号 WO96/29096
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP96/00652 1996年3月15日(15.03.96)		(43) 国際公開日 1996年9月26日(26.09.96)	
(30) 優先権データ 特願平7/59261 1995年3月17日(17.03.95) JP		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)[JP/JP] 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 隈 秀和(KUMA, Hidekazu)[JP/JP] 飯島 修(IJIMA, Osamu)[JP/JP] 鈴木要介(SUZUKI, Yousuke)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1-25-11 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyoze et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

PTO 2002-3809

STIC Translations Branch

(54) Title: GENE TRANSFER PREPARATION

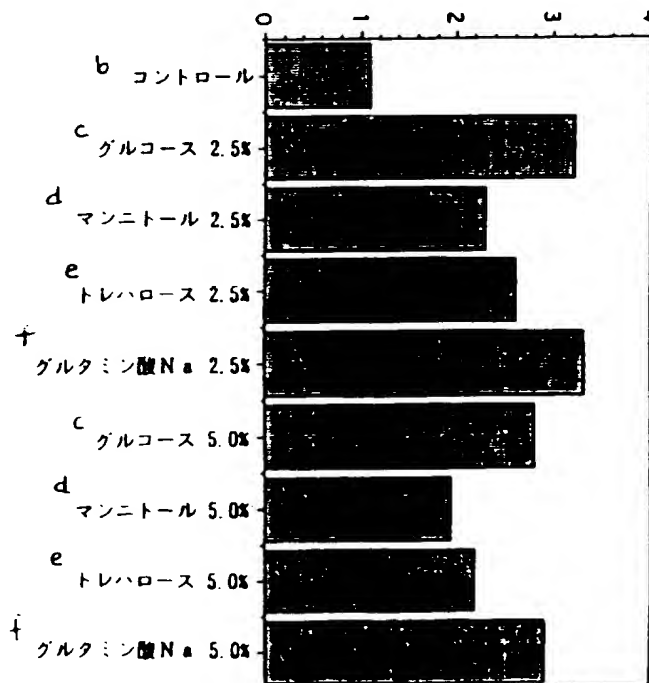
(54) 発明の名称 遺伝子導入製剤

(57) Abstract

A process for producing gene transfer preparations by freeze-drying a mixture of a recombinant virus vector with at least one additive selected among arginine, glutamic acid (or sodium salt thereof), serine, glucose, inositol, lactose, mannitol, sorbitol, trehalose and xylose.

- a ... Gene transfer efficiency
- b ... Control
- c ... Glucose
- d ... Mannitol
- e ... Trehalose
- f ... Sodium glutamate

遺伝子導入効率 ($\times 10^4$ cfu/ml) ^a



(57) 要約

アルギニン、グルタミン酸（またはそのナトリウム塩）、セリン、グルコース、イノシトール、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、トレハロースおよびキシロースから選択される1以上の添加剤を組換えウイルスベクターに添加し、凍結乾燥することからなる遺伝子導入製剤の製造方法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LR	レソト	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SD	スーダン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SG	シンガポール
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	GU	グアム	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド			TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
			朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
						UZ	ウズベキスタン

明細書

遺伝子導入製剤

技術分野

- 本発明は、遺伝子治療用ウイルスベクターの安全で保存安定性に優れた凍結乾燥製剤の製造方法および該方法で得られる遺伝子導入製剤に関する。

背景技術

- 遺伝子工学の急速な発展により、様々な分子生物学的手法の開発が行われてきた。それにともなって、遺伝子情報の解析および遺伝子の機能解明においては著しい進歩がみられ、そこから得られた成果を実際の治療現場に還元しようとする試みが数多く行われている。その中でも、最も進歩の著しい分野の1つとして遺伝子治療分野があげられる。種々の遺伝性疾患における原因遺伝子の発見、解読が行われる一方、それらの遺伝子を物理的および化学的手法により細胞内に導入する方法が開発され、遺伝子治療は基礎的実験の段階から、実際の臨床応用が行われるまでに発展してきている。
- 15 遺伝子治療の臨床応用としては、1989年米国において初めて遺伝子治療の臨床試験が行われて以来、すでにイタリア、オランダ、フランス、イギリス、中国においても臨床試験が開始されている。特に米国においては、1994年7月までに54の遺伝子治療プロトコルがNIHの組換えDNA委員会(RAC)で承認され、先天性免疫不全症(アデノシンデアミナーゼ欠損症)、家族性高コレステロール血症、嚢胞性線維症等の遺伝性疾患およびグリオーマや悪性黒色腫等の各種癌に対しての遺伝子治療の試みがなされている。また、最近ではAIDSに対する遺伝子治療の基礎的検討も数多くなされるようになってきている。

- 遺伝子治療は、遺伝子導入する細胞(標的細胞)の種類により生殖細胞遺伝子治療(Germline Cell Gene Therapy)と体細胞遺伝子治療(Somatic Cell Gene Therapy)に分類されている。また、異常(原因)遺伝子をそのままにして、新しい(正常)遺伝子を付け加える付加遺伝子療法(Augmentation Gene Therapy)

y)と、異常遺伝子を正常遺伝子で置き換える置換遺伝子療法 (Replacement Gene Therapy) に分類されているが、現時点では倫理的および技術的制約から、体細胞に対する付加遺伝子治療のみが行われている。さらに、遺伝子治療の方法としては、まず患者から標的細胞を体外に取り出し、目的とする遺伝子を導入した後に再びその細胞を患者の体内に戻すという自家移植による方法 (ex vivo 遺伝子治療) が現在行われているが、将来的には遺伝子を直接患者に投与する方法 (in vivo 遺伝子治療) も検討されている。

以上のような遺伝子治療の臨床応用における大きな技術的課題の1つとして、いかにして外来遺伝子を効率良く安全に標的細胞へ導入出来るか、ということがある。1980年代初期にはマイクロインジェクションなど物理的手法の応用が試みられたが、遺伝子の導入効率が低く、安定に導入することができず、さらには当時の大量細胞培養技術の限界等もあり実用化にはつながらなかった。その後、外来遺伝子を効率良く標的細胞に導入するためのベクターとなる組換えウイルス (ウイルスベクター) が開発され、初めて遺伝子治療の臨床応用が可能となった。

15 ウイルスベクターには以下に示すようにいくつかの種類があるが、現在おこなわれている遺伝子治療において、最も広く使用されているウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス (MoMLV: Moloney Murine Leukemia Virus) 由来のレトロウイルスベクターであり、本ウイルスの増殖様式の利点を利用したものである。レトロウイルスは、エンベロープをもつRNAウイルスであり、そのエンベロープ蛋白と宿主細胞側のレセプターが結合することにより細胞内に侵入する。侵入後、単一鎖ウイルスRNAが逆転写酵素により二重鎖DNAに変換され、感染細胞ゲノムDNAに、無作為であるが安定的に組み込まれる。ただし組み込まれるためには、細胞が分裂増殖していなければならない (D. G. Miller, et al., Molecular and

20 Cellular Biology, 10, 8, 4239, 1990)。組み込まれたレトロウイルス遺伝子はプロウイルスと呼ばれる。そのプロウイルスからRNAが転写され、ウイルス蛋白が合成される。それらの蛋白とウイルスRNAにより、新しいウイルス粒子がつくられる。この場合のレトロウイルス遺伝子

を外来遺伝子に組換えたものがレトロウイルスベクターである (A. D. Miller, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158, 1, 1992)。レトロウイルスベクター、特にMoMLVベクターについてはこれまでに非常に多くの研究があり、その安全性についても多くの改良が加えられてきており、現在まで大きな問題は発生していない。しかしながら、MoMLVベクターにおいては標的細胞のゲノムDNAへの組み込みがランダムであることや、ウイルス遺伝子の一部であるロングターミナルリピート (以下LTR) が遺伝子発現のためのプロモーション活性を有するという性質が知られている。そのため、これまでに報告はないものの、ランダムな外来遺伝子組み込みが行われた結果、偶然その近傍に存在する癌遺伝子を活性化して標的細胞を癌化させるという可能性を完全に否定することができず、さらに安全なベクターの開発が強く望まれている。さらに、MoMLVベクターにおいて実用的に一番問題となっているのは、非分裂細胞に遺伝子導入できない点である。そのため、多くの先天性代謝異常症で問題となる神経細胞の遺伝子修復が行えない。それ以外にも、遺伝子治療の対象細胞となっている造血幹細胞、肝細胞、筋細胞なども、通常はほとんど静止期にあるために遺伝子導入効率は低い。体外に取り出した細胞については、遺伝子導入効率を高めるために分裂を促進するような処理が行われているが、生体内でこれらの細胞に遺伝子導入を行うことは難しいと考えられ、今後は非分裂細胞に対しても効率的に遺伝子を導入できるベクターの開発が必要とされている。

ヘルペスウイルスベクターは神経細胞への外来遺伝子導入が可能なベクターとして期待されている (T. D. Palella, et al., *Mol. Cell Biol.*, 8, 457, 1988) が、細胞毒性が強く、さらにウイルス自体のゲノムサイズが150kbと非常に大きいために現在のところ開発は進んでいない。

HIVベクターはウイルス自体の宿主特性により、CD4陽性Tリンパ球に対して特異的遺伝子導入を可能とするベクターとして開発された (T. Shimada, et al., *J. Clin. Invest.*, 88, 1043, 1991)。リンパ球は先天性免疫不全症、AIDS、癌などの遺伝子治療を行う際

に重要な標的細胞となっているため、HIVベクターの有用性には高い期待が寄せられている。HIVベクターには、最大の欠点として野生株混入の可能性という問題があるが、これらが解決されれば血管内投与法による *in vivo* 遺伝子治療に使用できる可能性がある。

5 アデノウイルスベクターは非分裂細胞へも遺伝子が導入できること、またベクターを容易に10の10乗程度まで濃縮できるため最近最も注目を集めている。最近の研究によりこのアデノウイルスベクターで、気道上皮細胞、肝細胞、筋細胞などへ *in vivo* で高率に遺伝子導入できることが示されている (L. D. Lavrero, et al., Hum. Gene Therapy, 1, 2
10 41, 1990. B. Quantin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 2581, 1992)。その一方で、本ベクターには外来遺伝子を細胞内に導入した際にゲノムDNAに組み込まれないという本質的な性質があり、ベクターを標的細胞に作用させても数週間、長くても数カ月で遺伝子導入の効果はなくなってしまう。そのため遺伝子導入を頻回に繰り返す必要
15 があり、患者への肉体的、精神的な負担の増加、抗アデノウイルス抗体の出現による遺伝子導入効率の低下等が問題となっている。また、現在、嚢胞性線維症の治療のためにアデノウイルスベクターを経気管支鏡的に肺に投与する臨床試験が開始されているが、アデノウイルス粒子の免疫原性および細胞毒性に起因するとみられる炎症反応が発生するといわれている。

20 一方、AAV (Adeno-associated virus) ベクターは、外来遺伝子が標的細胞ゲノムDNA内に組み込まれること、病原性、細胞毒性がないこと (N. Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158, 97, 1992) などを特徴としている。さらに、ウイルス粒子へのパッケージングやゲノム
25 DNAへの遺伝子組み込みに必要な ITR (Inverted Terminal Repeat) は遺伝子発現のためのプロモーション活性がないことから、目的に合った内部プロモーターを設定することにより、遺伝子発現のオン/オフや組織特異的プロモーターの使用が可能となると同時に、宿主範囲が広く様々な標的細胞/疾患に対応できるため、MoMLVベクターに代わる新しいウイルス

ベクターとして期待されている。また、野生型のAAVは第19染色体の特定の位置に組み込まれることも発見され(M. Suwadogo and R. G. Roeder, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 4394, 1985)、遺伝子組み込み位置をターゲティングできるベクターとして注目されている。

しかしながら、いずれのウイルスベクターにおいても、それらを安定に保管し均一性を保つための製剤学的検討は行われていない。現在のところ、ウイルスベクターは凍結保存されて使用されているが、保存期間に制限があり、時間の経過とともにウイルスベクターの力価が低下することが観察されている。そのため、実際の臨床研究においては各試験ごとにベクターを製造すると同時に、治療前には保管期間中の遺伝子導入効率の低下について試験を行う必要がある。このような試験は、方法が非常に複雑であると同時に、結果がでるまでにかなりの時間を要するため、より均一な性能で安定化されたウイルスベクターの供給方法の確立が強く望まれている。

MoMLVベクターの凍結乾燥については試みられた例(H. Kotani et al. Human Gene Therapy, 5, 19, 1994)も存在するが、安定化剤としてゼラチンが用いられている。ゼラチンは通常ブタなどの動物由来のものを使用しており、それゆえこれを生体にin vivo投与した際には免疫原となりうる可能性が高く、必ずしも安全な方法であるとはいえない。

現在行われている遺伝子治療の臨床研究においては、用いられるベクターの種類および治療用遺伝子の薬理効果に関しては詳細に検討がなされている。しかし、ウイルスベクターは遺伝子治療用の製剤であるため、今後より多くの遺伝子治療が行われるにあたっては、安全で均一な性能のベクターを安定に供給する技術、すなわちベクターの安定な保管方法の開発が必要不可欠とされている。しかしながら、そのような分野に関する検討例は非常に少ない。

発明の開示

上記した課題を解決するために鋭意研究した結果、本発明者らは安全で均一な

性能のウイルスベクターを安定に供給する技術、すなわちウイルスベクターの安定な保管方法を開発することに成功した。これによって、各種ウイルスベクターを、遺伝子導入効率を低下させずに凍結乾燥することが可能になる。

従来いくつかの種類のウイルスは、凍結乾燥を行っても感染性を失わないことが知られてきた。その際、添加剤としてはゼラチンおよび糖が加えられるのが一般的である。一方、ウイルスと類似のウイルスベクターにおいても、上述のように凍結乾燥の試みがなされている。しかし、その場合も添加剤としてはゼラチンおよび糖が加えられており、生体に *in vivo* 投与した際には免疫原となりうる可能性が高く、必ずしも安全な方法であるとはいえない。

そこで本発明においては、ゼラチン等の免疫原となりうる成分を含有せず、しかも医薬品添加物としてすでに使用前例がある低分子物質のみを添加剤として用いて、遺伝子導入効率を高く保つ凍結乾燥方法の開発を行った。

すなわち、本発明は、アルギニン、グルタミン酸（またはそのナトリウム塩）、セリン、グルコース、イノシトール、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、トレハロースおよびキシロースから選択される1以上の添加剤を組換えウイルスベクターに添加し、凍結乾燥することからなる遺伝子導入製剤の製造方法を提供する。

本発明はまた、上記方法によって製造される遺伝子導入製剤を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、各種の添加剤を5%濃度で加えたときの遺伝子導入の効率を示すグラフである。

図2は、各種の添加剤を2.5%および5%濃度で加えたときの遺伝子導入の効率を示すグラフである。

図3は、2.5%濃度の2種の添加剤を組み合わせで加えたときの遺伝子導入の効率を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法が使用できるウイルスベクターは、上記したMoMLV（マウス

白血病ウイルス)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ベクターなどの遺伝子治療に用いられるいかなるウイルスベクターであってもよい。このようなウイルスベクターをDMEM培地などの培地、あるいはPBSに
5 溶解してウイルスベクター原液を調製する。ウイルスベクター原液の濃度はいかなるものであってもよい。

本発明の方法は上記ウイルスベクター原液に添加剤を加えて、これを凍結乾燥することによって達成される。本発明において使用できる添加剤は免疫原性の低い物質が好ましく、低分子のアミノ酸およびその誘導体、糖およびその誘導体で
10 ある。

アミノ酸およびその誘導体としてはアルギニン、グルタミン酸(またはそのナトリウム塩)およびセリンが好ましく、特に、グルタミン酸またはそのナトリウム塩が好ましい。

糖およびその誘導体としてはグルコース、イノシトール、ラクトース、マンニ
15 トール、ソルビトール、トレハロースおよびキシロースが好ましく、特にグルコースが最も好ましい。

使用するウイルスベクターの種類、ウイルスベクター溶液の濃度などにより、これらのアミノ酸および糖から選択される1以上を自由に組み合わせて添加剤とすることができる。アミノ酸のみの組み合わせ、糖のみの組み合わせ、アミノ酸
20 と糖との組み合わせから選択できる。グルタミン酸ナトリウムとグルコースとの組み合わせが高い遺伝子導入効率(ウイルスベクター力価)を保持する点から最も好ましい。

アミノ酸および糖から選択される各添加剤のベクター溶液に対する重量比はそれぞれ約1~約10%であり、好ましくはそれぞれ約1.5~約7%であり、もっ
25 と好ましくは約1.5~約5%である。

さらには、アスコルビン酸、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールや、保存料を添加してもよい。また、ウイルスベクター溶液は等張であることが好ましく、このためウイルスベクター溶液にバッファーを加えて浸透圧を調整することができる。

このようにして得られた各種添加剤を加えたウイルスベクター溶液を凍結乾燥する。凍結乾燥は公知の方法を用いることができ、例えば、液体窒素で凍結後、凍結乾燥機（フィンアクア社製）により行うことができる。凍結乾燥した遺伝子導入製剤はバイアル中に封入し、好ましくは低温で使用時まで保管する。本発明
5 の遺伝子導入製剤は使用時に水で再生することができる。以下の実施例で示すように、水で再生したウイルスベクターは高い遺伝子導入効率を保持していた。

本発明によって、ゼラチン等の免疫原となりうる成分を含有せず、しかも医薬品添加物としてすでに使用前例がある低分子物質のみを添加剤として用いて、遺伝子導入効率を高く保つ遺伝子導入製剤を得ることができる。本発明の遺伝子導入製剤は保管が容易で、かつ安定した力価を保持することができ、あらゆるウイルスベクター製剤に用いることができ、その応用範囲は極めて広い。
10

実施例

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

15 実施例 1：組換え MoMLV ベクターの調製

直径 9 cm の細胞培養用ディッシュに、ネオマイシン耐性遺伝子を含んだ組換え MoMLV ベクターの産生細胞である PA 317/ β -19（日本医科大学島田教授より供与）を播種し、ウシ胎児血清（ギブコ社製）10%含有 DMEM（ギブコ社製）中で、80%コンフルエントまで通常の条件（37℃、二酸化炭素濃度 5%）で培養する。細胞が 80%コンフルエントまで培養した後、培地を
20 交換し、12 時間後に組換え MoMLV ベクターを含んだ培地を回収し、これをベクター原液とする。

実施例 2：組換え MoMLV ベクター溶液の調製および凍結乾燥

実施例 1 で得られたベクター原液に、図 1～図 3 に記載するアミノ酸、糖、またはこれらの組み合わせを添加剤として、最終濃度 5% または 2.5% となるように加えた。液体窒素で凍結後、凍結乾燥機（フィンアクア社製）により、一昼夜凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は使用するまで -40℃ に保管した。また、添
25

加剤を加えないものも調製し、それをコントロールとして用いた。なお、すべての添加剤は和光純薬社製のものを用いた。

実施例3：組換えMoMLVベクターの力価（遺伝子導入効率）測定方法

直径6cmの細胞培養用ディッシュに、3T3細胞（大日本製薬社製）を播種
5 し、ウシ胎児血清（ギブコ社製）10%含有DMEM（ギブコ社製）中で80%
コンフルエントまで通常の条件（37℃、二酸化炭素濃度5%）で培養を行った。
細胞が80%コンフルエントまで培養した後、力価測定に用いた。

実施例2において得られた凍結乾燥品に注射用蒸留水（大塚製薬製）を加え、
凍結乾燥前と同容積のベクター再懸濁液を調製した。得られたベクター再懸濁液
10 10 μ lとウシ胎児血清10%含有DMEM990 μ lを加えて混合し、力価測
定用ベクター溶液を調製した。80%コンフルエントまで培養した3T3細胞の
培地を取り除き、そこに力価測定用ベクター溶液1000 μ lを加え、通常の条
件で培養を行った。4時間後、ウシ胎児血清10%含有DMEM3mlを加え、
さらに24時間培養を継続した。その後、ネオマイシンのアナログであるG41
15 8（ギブコ社製）を800 μ g/mlの濃度で含有するウシ胎児血清10%含有
DMEMで培養を続け、生成した薬物耐性コロニーの数を力価（cfu/ml）
とした。

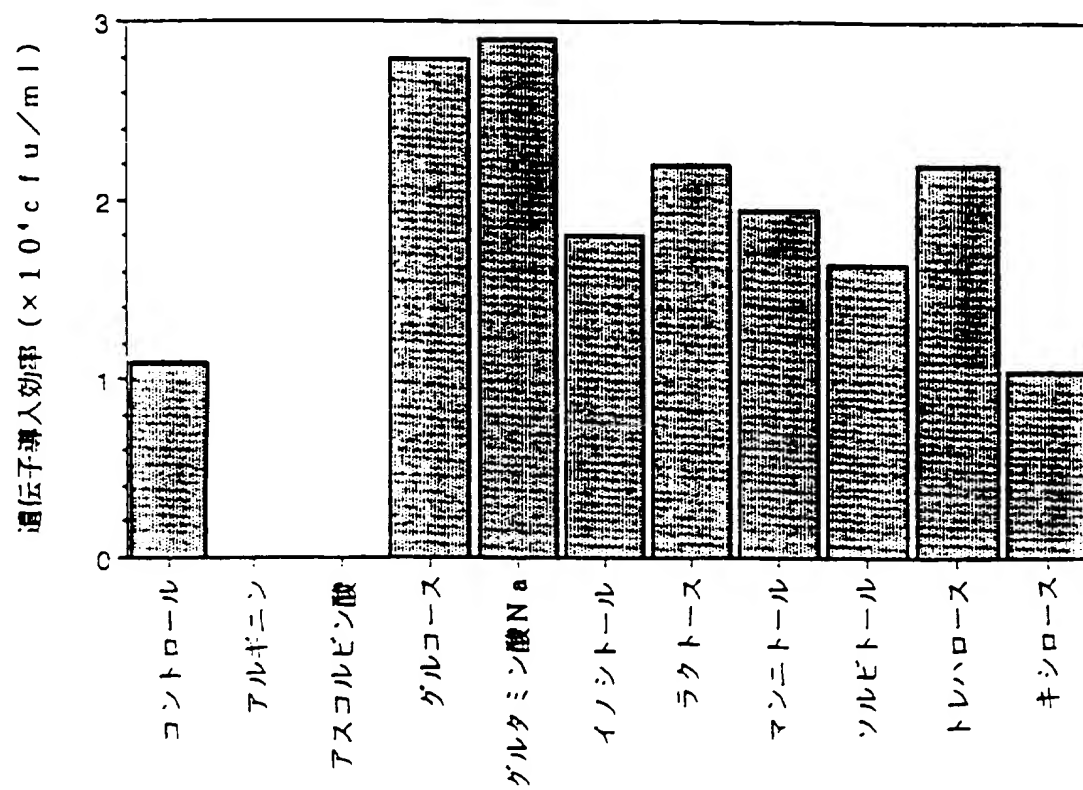
実施例4：組換えMoMLVベクターの力価測定

各種添加剤を5%濃度で用いた場合の結果を図1に示す。グルコース、グルタ
20 ミン酸ナトリウム、マンニトール、トレハロースにおいて力価が高いことが明ら
かとなった。それらの2.5%添加時および2種類の添加剤を混合して用いた場
合の結果を図2および図3に示す。以上の結果より、グルコースとグルタミン酸
ナトリウムを添加剤として用いることにより、高い力価を有するウイルスベク
ターの凍結乾燥品が得られることが明らかとなった。

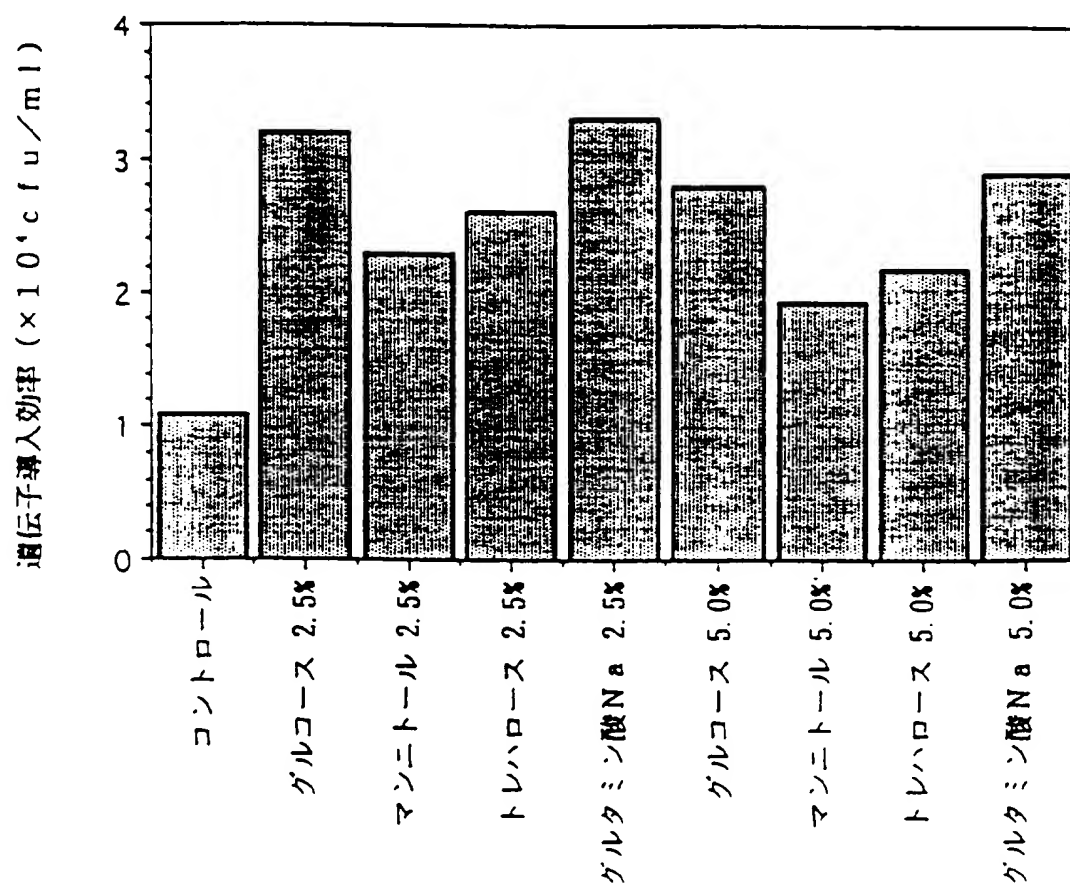
請求の範囲

1. アルギニン、グルタミン酸（またはそのナトリウム塩）、セリン、グルコース、イノシトール、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、トレハロースおよびキシロースから選択される1以上の添加剤を組換えウイルスベクターに添加し、凍結乾燥することからなる遺伝子導入製剤の製造方法。
- 5 2. 各添加剤のベクター溶液に対する重量比がそれぞれ約1～約10%である請求項1記載の方法。
3. 添加剤がグルタミン酸（またはそのナトリウム塩）とグルコースの組み合わせである請求項1記載の方法。
- 10 4. 請求項1の方法によって製造される遺伝子導入製剤。

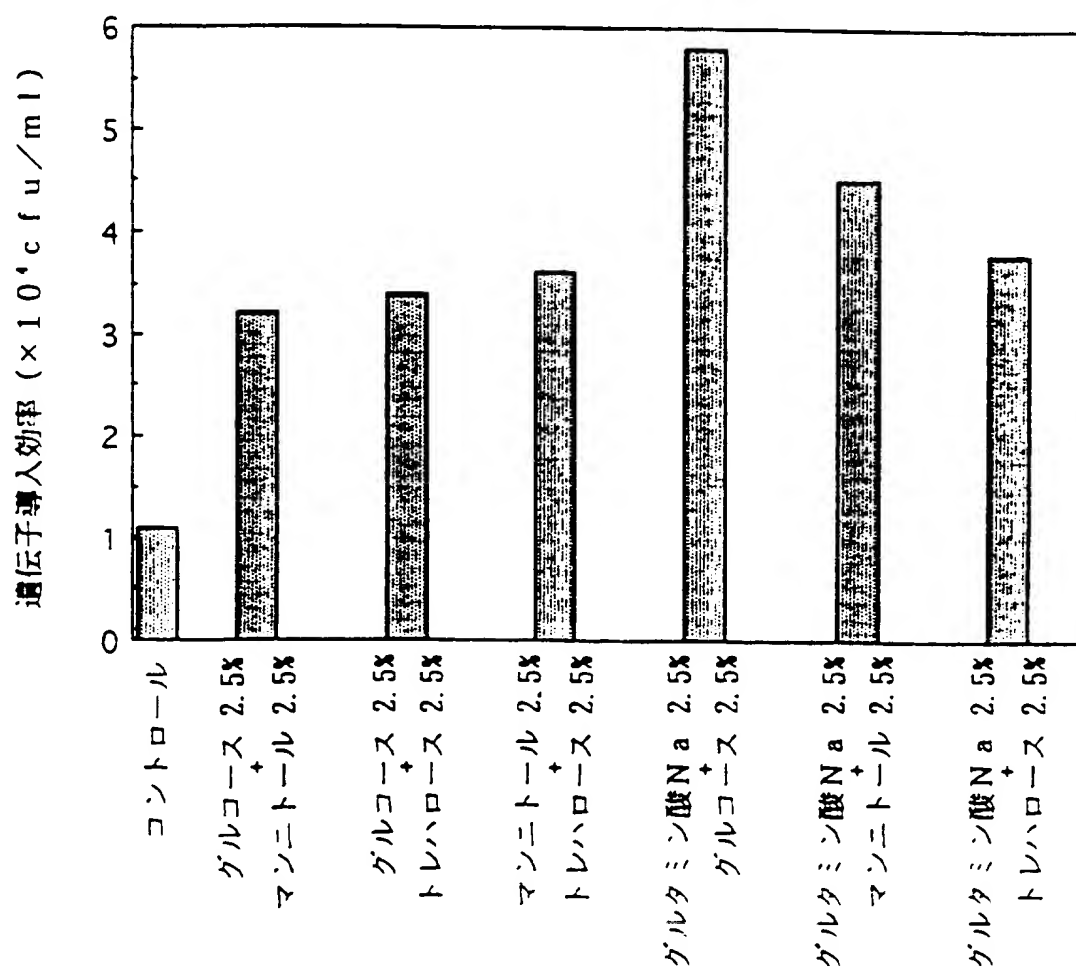
1/3



2/3



3/3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K48/00, 9/14, 31/70, 35/76, 47/10, 47/18, 47/26 //
C12N7/01, 15/68, 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K48/00, 9/14, 31/70, 35/76, 47/10, 47/18, 47/26,
C12N7/01, 15/68, 15/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	By Tomonokai of National Institute of Health "Rev. ed. 2 Experimental Virology General Description" (1973), Maruzen, p. 53-59, Section of "5-2 Freeze-drying"	1 - 4
A	WO, 95/19427, A (Genetic Therapy Inc.), July 20, 1995 (20. 07. 95) (Family: none)	1 - 4
A	Chemical Abstracts, Vol. 121 (1994) Abstract No. 223170 (Human Gene Therapy, Vol. 5, No. 1 (1994), p. 19-28, (H. Kotani et al.),	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 6, 1996 (06. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

June 18, 1996 (18. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁸ A61K48/00, 9/14, 31/70, 35/76, 47/10, 47/18, 47/26
// C12N7/01, 15/68, 15/86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁸ A61K48/00, 9/14, 31/70, 35/76, 47/10, 47/18, 47/26
C12N7/01, 15/68, 15/86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	国立予防衛生研究所学会編「改訂二版 ウイルス実験学 総論」 (昭和48年), 丸善, p. 53~59, "5・2 凍結乾燥法" の項	1~4
A	WO, 95/19427, A, (Genetic Therapy Inc) 20. 7月. 1995 (20. 07. 95) (ファミリーなし)	1~4
A	Chemical Abstracts, Vol. 121 (1994) 抄録番号223170 (Human Gene Therapy, Vol. 5, No. 1 (1994), p. 19~28, (H. Kotani 他))	1~4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 06. 96

国際調査報告の発送日

18.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司

4C 8314

電話番号 03-3581-1101 内線 3452